昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, March 2008, 51(3): 246 – 257 ISSN 0454-6296

家蚕高密度 AFLP 连锁图谱的构建

张 烈[1,2],钱 敏[2],代方银[2],赵爱春[2],鲁 成[2,*]

(1. 西华师范大学生命科学学院,珍稀动植物研究所,四川南充 637009;
2. 西南大学生物技术学院,农业部蚕学重点实验室,重庆 400716)

摘要:为了进行家蚕 *Bombyx mori* 数量性状的 QTL 定位研究,以白色茧系品种 C_{100}(♀)和近交系大造(P50)(♂)杂交得到 F_1,用 F_1(♂)与双隐性标记的 C_{100}(♀)回交,得到回交一代(BC_1),用改进的 AFLP 分子标记方法,经 96 组选择性扩增引物扩增,获得分离比为 1:1($P \leqslant 0.05$)的 1 744 个 AFLP 位点。用 Map Manager QTXb19(Version 0.29)连锁图谱构建软件,构建了具有 814 个标记,36 个连锁群的家蚕高密度 AFLP 分子标记连锁图谱。该连锁图谱覆盖的家蚕基因组长度为 13 005 cM,连锁群长度变化范围为 109.0 ~ 1 573.7 cM,连锁群的平均长度为 361.25 cM,其标记间平均图距 15.98 cM,最小图距 2.3 cM,最大图距 47.7 cM,标记间大于 30 cM 的 gap 共有 39 个。该连锁图平均每个连锁群 23 个标记,最多一个连锁群有 92 个标记,最少 8 个标记。该连锁图谱确定了与经典实验遗传图谱第 15 连锁群和 W 染色体连锁群相对应的两个连锁群。

关键词:家蚕;分子标记;AFLP;连锁图谱
中图分类号:Q966 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2008)03-0246-12

A dense linkage map of the silkworm (*Bombyx mori*) based on AFLP markers

ZHANG Lie[1,2], QIAN Min[1], DAI Fang-Yin[1], ZHAO Ai-Chun[1], LU Cheng[1] (1. Institute of Rare Animals and Plants, College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637009, China; 2. Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Department of Sericulture and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: For studying QTL of silkworm quantitative traits, the backcross hybrid was obtained with female of a commercial race C_{100} crossing with male of the first filial hybrid of C_{100} and Dazao. Based on improved AFLP method, 1 744 AFLP markers in agreement with 1:1 segregation ratio ($P \leqslant 0.05$) were obtained employing 96 pairs primers, and a dense linkage map composing of 36 linkage groups of 814 loci was constructed employing the Map Manager QTXb19 (Version 0.29) software. The total length of the groups was 13 005 cM and the distances between loci were 2.3 to 47.7 cM. The average length of the groups was 361.25 cM and the average length between loci was 15.98 cM, and only 39 gaps whose distance between loci was more than 30 cM were in the constructed map. The number of loci in the constructed map ranged from 8 to 92 and the average loci of the groups was 23. Two groups of the constructed map correspond with the 15th and W chromosome of traditional linkage map.

Key words: *Bombyx mori*; molecular marker; AFLP; linkage map

遗传连锁图谱的构建是遗传学和育种研究的重要内容之一,构建高密度的遗传连锁图谱有助于加快动、植物育种工作进程,特别是有助于动、植物数量性状的改良研究。仅用形态标记构建的遗传连锁图谱由于标记数量的有限,不能满足构建高密度遗传连锁图谱的需要。20 世纪 80 年代诞生的分子标记技术,使构建高密度的分子标记遗传连锁图谱成为可能,因此,利用各种分子标记技术构建分子标记

基金项目:"973"计划项目(2005CB121000);四川省教育厅项目(2005A105);西华师范大学科研启动基金项目(05B040)
作者简介:张烈,男,1964 年生,四川巴中人,博士,研究方向为家蚕分子遗传与育种研究,E-mail: zhanglie01@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lucheng@swu.edu.cn
收稿日期 Received: 2007-05-15;接受日期 Accepted: 2008-01-28

遗传连锁图谱是遗传学和育种研究的重要途径之一。在一些动、植物如家蚕 *Bombyx mori*（Goldsmith and Shi，1994；Promboon *et al*.，1995；李斌等，2000；万春玲等，2001；赵爱春等，2004）、波尔山羊（李祥龙等，2004）、中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis*（王伟继等，2006）、玉米 *Zea mays*（Bentolila *et al*.，1991；郝转芳等，2005）、水稻 *Oryza sativa*（Mackill *et al*.，1996；熊立仲等，1998）、大豆 *Glycine max*（Keim *et al*.，1997）、马铃薯 *Solanum tuberosum*（纪颖彪和屈冬玉，1997）构建了标记密度不等的各种分子标记的连锁图谱。这些分子标记连锁图谱的构建为基因的定位、克隆以及数量性状的遗传研究奠定了基础，对其进一步的研究和利用有利于提高动、植物育种工作效率和加快育种工作的进展。

AFLP 分子标记技术是由 Vos 等（1995）在 RFLP 技术和 RAPD 技术的基础上发展起来的一种高效分子标记。AFLP 分子标记技术既具有 RAPD 分子标记技术的方便性又具有 RFLP 分子标记技术的稳定与可靠性（王斌和翁曼丽，1996），特别是在对生物遗传背景不甚了解的情况下，利用 AFLP 分子标记技术对基因组各部分可能存在的 DNA 序列变异进行扫描，从而发现不同个体间的多态性。AFLP 分子标记技术克服了 RAPD 分子标记技术的不稳定性和 RFLP 分子标记技术受探针来源的限制，因此，AFLP 分子标记可用于生物遗传研究分析的许多方面，如遗传连锁图谱的构建，目的基因的定位、品种鉴别、分类和系统发育研究等多个方面。

家蚕 *B. mori* 是重要的经济昆虫，作为生产已有五千多年的历史，作为遗传学研究材料，家蚕具有其他动物所不可替代的易于繁殖、饲养，繁殖后代数量较多等优点。对家蚕的遗传学及其应用研究也积累了较为丰富的经验，并保存了大量的品种资源，利用部分品种资源已构建了含有 440 多个形态标记的家蚕遗传连锁图谱（代方银等，2005）。形态标记的数量有限及其多态性不丰富，对进一步开展由多基因控制的数量性状遗传以及基因的定位等研究显得十分乏力，因此利用分子标记技术构建家蚕分子标记遗传连锁图谱显得十分重要。如果构建了家蚕高密度的分子标记遗传连锁图谱就可以进一步开展家蚕分子辅助育种研究。Goldsmith（1991）首先提出了国际家蚕分子育种计划，构建了仅 60 个 RFLP 标记的家蚕分子标记连锁图谱框架，并倡导进行有关家蚕的 QTL 定位研究。继 Goldsmith 后，构建了家蚕的 RFLP（Shi *et al*.，1995）、RAPD（Promboon *et al*.，1995；李斌等，2000）、SSR（Miao *et al*.，2005）和 AFLP（朱玉芳等，2001；Tan *et al*.，2001；赵爱春等，2004）标记连锁图谱。这些家蚕分子连锁图谱的构建，为进一步开展家蚕高密度分子连锁图谱的构建和利用研究奠定了基础。这些已构建的各种家蚕分子标记遗传图谱仅仅是一个框架图谱，都具有标记数较少，覆盖家蚕基因组较小等特点，因此这些图谱还不能满足家蚕分子辅助育种研究的要求。本研究采用实用品种 C_{100}（白色茧）与广泛用于家蚕分子标记构图研究的基础品种大造（绿色茧）为材料进行杂交、回交，应用改进的 AFLP 分子标记方法以及 Map Manager QTXb19（Version0.29）（Manly *et al*.，2001）软件进行连锁分析，构建家蚕高密度 AFLP 分子标记遗传连锁图谱，为进一步进行家蚕数量性状的 QTL 分析和分子标记辅助家蚕育种研究奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料

作图群体：采用生态型差异较大的高交代实用白色茧系品种 C_{100}（♀）和西南大学家蚕基因库培育的近交系大造（P50）（♂）杂交得到 F_1，用 F_1（♂）与双隐性标记的 C_{100}（♀）回交，得到回交代（BC_1）。按家蚕常规饲育方法在 25℃左右，给予良桑饲养，待结茧化蛹后，随机取回交代（BC_1）的 44 个个体，其中绿色茧 22 个（雌、雄各 11 个），白色茧 22 个（雌、雄各 11 个）以及回交代的亲本同胞后代各 10 个用于基因组 DNA 提取。

1.2　主要试剂和酶

Pst Ⅰ和 *Taq* Ⅰ限制性内切酶，T_4 DNA 连接酶，dNTPs，尿素，TEMED，Q4132 测序银染试剂盒，由 Promega 公司生产；Taq DNA 聚合酶，甲叉双丙烯酰胺，丙烯酰胺，由上海生物工程有限公司（Segon）分装；结合硅烷、剥离硅烷等。

人工接头和引物：人工接头包括两部分，一部分为核心序列（CORE），另一部分为酶特定序列（ENZ），能与用 *Pst* Ⅰ、*Taq* Ⅰ酶解的基因组 DNA 片段粘端互补。人工接头由上海生物工程有限公司（Segon）合成。其结构如下：

CORE	ENZ
5′-GACGTGACGGCCGTC	ATGCA -3′
3′-GCACTGCCGGCAG	T-5′

Pst Ⅰ 人工接头

CORE	ENZ
5′-GACGATGAGTCCTGA	G-3′
3′-TACTCAGGACT	CGC -5′

Taq Ⅰ 人工接头

根据人工接头序列设计相应的选择性引物。引物由 3 部分组成：核心序列(CORE)、酶特定序列(ENZ)和选择性碱基(ENT)。

	CORE	ENZ	ENT
Pst Ⅰ 预扩增引物：	5′-GACGGCCGTC	ATGCAG	A-3′
Taq Ⅰ 预扩增引物：	5′-GATGAGTCCTGA	GCGA	A-3′

1.3 AFLP 模板制备、酶切片段扩增和凝胶分析

取蛹体的 1/3 ~ 1/2(大小约重 0.5 g)提取基因组 DNA。基因组 DNA 模板的制备参照 Williams 等(1990)和夏庆友等(1998)的方法。基因组 DNA 的完整性经琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)，并用 BIO-RAD Smart spec™ 3000 分光光度计测定其浓度，然后用 TE 稀释，保证基因组 DNA 的纯度(A_{260}/A_{280})在 1.8 左右。

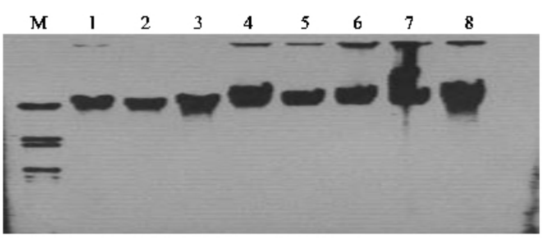


图 1 家蚕基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis pattern of silkworm genomic DNA

M：DNA 分子量标准 λ/*Hin*dⅢ marker；1 ~ 8 分别为样品 7(Gr ♂)、9(Gr ♂)、15(Gr♀)、16(Gr♀)、26(W♀)、27(W♀)、46(W ♂)和 47(W ♂)的基因组 DNA The lanes 1 to 8 showed genomic DNA of silkworm 7(Gr ♂), 9(Gr ♂), 15(Gr♀), 16(Gr♀), 26(W♀), 27(W♀), 46(W ♂) and 47(W ♂), respectively.

取完整基因组 DNA 100 ng 加入 5 单位 *Pst* Ⅰ 限制性内切酶 37℃温育 2 h，再加入 5 单位 *Taq* Ⅰ 限制性内切酶 65℃温育 2 h 对基因组进行酶切，将其酶切产物在 75℃下保持 15 min，使内切酶灭活后，酶切产物储于 4℃备用。取 5 μL 酶切消化产物用 T4 连接酶将双链接头连接到经酶切后的 DNA 片段上，再用具有一个选择性碱基的引物对连接产物进行预扩增。预扩增程序为：94℃变性 3 min；循环为 94℃变性30 s，56℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，20 循环；72℃延伸 7 min。用 1.2%琼脂糖凝胶检测预扩增结果(图 2)。以此预扩增产物稀释 1/80 后为模板，再用带 3 个选择性碱基的引物组进行选择性扩增。选择性扩增程序为：第一次循环为 94℃变性 30 s，65℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，随后的循环退火温度每次降低 0.7℃共 13 个循环；94℃变性30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，23 个循环；72℃延伸 7 min。用 1.2%琼脂糖凝胶检测选择性扩增结果。预、选择性扩增均在 Tehermolyne Amplitron Ⅰ型 DNA 合成仪上进行。选择性扩增产物先用琼脂糖凝胶电泳检测，防止扩增漏样，再用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶对选择性扩增产物进行分离。分离加样前先加入 6 μL 反应终止液，经 93℃变性 3 min 后，立即将其放入冰水中，待分离电泳液温度达到 50℃时快速将分离样品加入到加样孔，分离电泳中电泳液温度保持恒温 50℃。选择性扩增产物分离后，用银染法(参照 Promega Cat. Q4132 银染试剂盒使用说明书)显色检测变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

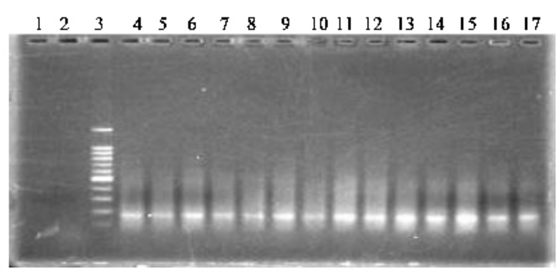


图 2 家蚕基因组 DNA 预扩增

Fig. 2 Electrophoresis pattern of preamplification of silkworm genomic DNA

1：没有预扩增引物 Deletion of preamplification primers；2：没有模板的预扩增结果 Deletion of template DNA；3：DNA 分子量标准 DNA Ladder marker；4 ~ 17：部分预扩增结果 Preamplifications of silkworm individuals, respectively.

1.4 数据统计分析

1.4.1 AFLP 标记数据的统计与分析：AFLP 分子标记数据获得方法参照 Zabeau 和 Vos(1992)建立的方法，并参考 RAPD 标记数据分析方法(Luch，1990；常青和周开亚，1998)将一个 AFLP 分子标记视为等位基因进行多态性分析。每一对引物分别对所有个体基因组的扩增，特定位置扩增出带的作为 1 个分子标记，并代表 1 对等位位点，扩增出带的个体为杂合

型记为‘H’，未扩增出带的个体为纯合型记为‘A’，对于部分模糊不清等原因造成判读较难的带型用“ - ’代替，以此作为数据记录的标准，将全部带型数据录入 Excel 表中。根据孟德尔遗传分离规律回交 F_1 代分离比应为 1∶1，对个体间的 AFLP 标记分离进行 χ^2 检验，在 5% 显著水平下，将符合 1∶1 分离比的标记用于遗传连锁图谱的构建。

表 1　选择性扩增引物序列

Table 1　Second amplification primer sequences

Pst Ⅰ 引物序列 Primer-*Pst* Ⅰ sequence	G+C 含量(%) G+C content	*Taq* Ⅰ 引物序列 Primer-*Taq* Ⅰ sequence	G+C 含量(%) G+C content
P1：5′-GACGGCCGTCATGCAGAAT-3′	55.6	T1：5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAT-3′	47.4
P2：5′-GACGGCCGTCATGCAGAAG-3′	61.1	T2：5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAC-3′	52.6
P3：5′-GACGGCCGTCATGCAGAAC-3′	61.1	T3：5′-GATGAGTCCTGAGCGAACA-3′	52.6
P4：5′-GACGGCCGTCATGCAGATA-3′	55.6	T4：5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAG-3′	52.6
P5：5′-GACGGCCGTCATGCAGATC-3′	61.1	T5：5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGA-3′	52.6
P6：5′-GACGGCCGTCATGCAGATG-3′	61.1	T6：5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGC-3′	57.9
P7：5′-GACGGCCGTCATGCAGAGA-3′	63.2	T7：5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGT-3′	52.6
P8：5′-GACGGCCGTCATGCAGACG-3′	68.4	T8：5′-GATGAGTCCTGAGCGAATA-3′	47.4
P9：5′-GACGGCCGTCATGCAGAGC-3′	68.4	T9：5′-GATGAGTCCTGAGCGAATC-3′	52.6
P10：5′-GACGGCCGTCATGCAGACA-3′	63.2	T10：5′-GATGAGTCCTGAGCGAACT-3′	52.6
P11：5′-GACGGCCGTCATGCAGACT-3′	63.2	T11：5′-GATGAGTCCTGAGCGAACG-3′	57.9
P12：5′-GACGGCCGTCATGCAGAGT-3′	63.2	T12：5′-GATGAGTCCTGAGCGAATG-3′	52.6

根据形态标记将家蚕雌性个体（家蚕的雌性基因型为杂合型 WZ）赋予杂合型有带‘H’标记，则雄性个体（家蚕的雄性基因型为纯合型 ZZ）赋予纯合型无带‘A’标记；根据茧色形态标记将绿色茧（G_c 基因对白色茧为显性，应包含纯合子 G_c/G_c 和杂合子 $G_c/+$ 两种基因型）赋予有带型‘H’标记，则白色茧（只包含隐性纯合子基因型 +/+）赋予无带型‘A”标记。

1.4.2　连锁图谱的构建：对符合 1∶1 遗传分离比的 AFLP 标记采用 Map Manager QTXb19（Version0.29）软件（Manly *et al*.，2001）进行连锁分析。连锁分析参数设置如下：$P=0.001$，使用其遗传连锁分析方式，选择 Backcross 遗传模式，作图函数为 Morgan，Make Linkage Groups 等命令进行连锁图谱构建。

2　结果与分析

2.1　扩增结果

2.1.1　引物的扩增效果：从 12 个 *Pst* Ⅰ 和 12 个 *Taq* Ⅰ 组合的 144 对双引物中筛选了 96 对扩增效果较好的引物组合进行选择性扩增，经 96 组选择性双引物对所有个体进行选择性扩增，扩增效果见图 3 和图 4，共获得了 8 522 个扩增位点。每组引物平均扩增位点 89 个，最多 161 个，最少 31 个；不同组双引物间的扩增位点数量相差较大，引物组以 P4 组合的扩增带较多，平均扩增带 106 个，P12 组合扩增带

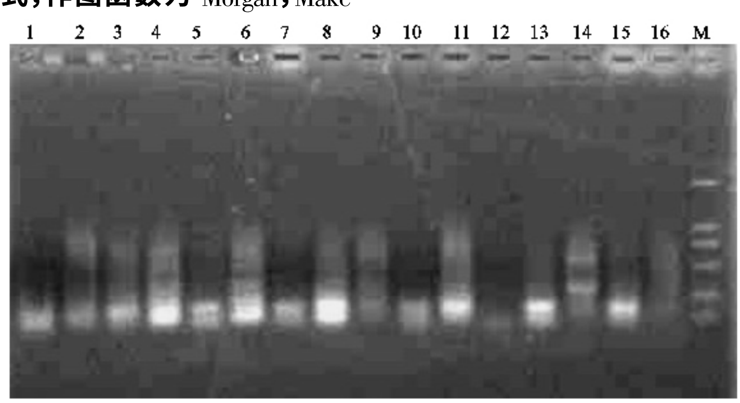


图 3　部分选择性扩增结果

Fig. 3　Second amplification of silkworm individuals

M：DNA 分子量标准 DNA Ladder marker.



图4 P2T5 选择性扩增产物的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoresis pattern of second amplification of P2T5 primer on denaturing polyacrylamide gel

M：100 bp DNA 分子量标准 100 bp DNA Ladder marker；1：绿茧亲本大造♂样品 Male of Dazao；2：白茧亲本 C_{100}♀样品 Female of C_{100}；3：F1 ♂样品 Male of F1；4～14：BC_1 绿茧♂ Male individuals of green cocoon BC_1；15～25：BC_1 绿茧♀ Female individuals of green cocoon BC_1；26～36：BC_1 白茧♀ Female individuals of white cocoon BC_1；37～47：BC_1 白茧♂的个体样品 Male individuals of white cocoon BC_1.

较少，平均 61 个。

2.1.2 扩增位点的多态性：在扩增位点中，非分离位点即所有个体都能扩增出的同一位点 3 318 个，分离位点即部分个体能够扩增出的位点 5 204 个，占总扩增出位点的 61%，其多态性与 Tan 等(2001)报道的 60.7%相一致。

对分离位点在 95% 置信度下经 χ^2 检验符合 1∶1分离比位点 1 744 个，偏分离位点 3 460 个，占分离位点 66.5%，这与万春玲等(2001)用 AFLP 标记得到的 1 177 个扩增带，偏分离位点 64.3%，以及 Voorrips 等(1997)用 AFLP 标记的偏分离位点 64.3% 相近。偏分离位点的发生在分子标记中是普遍存在的，其发生原因可能有：一是生物配子的生活力和竞争力的遗传因素、染色体的转位；二是作图群体数量大小、酶切基因组 DNA 不彻底、基因组 DNA 本身存在大量的断裂片段等原因造成的带型缺失或模糊不清。

2.2 连锁图谱构建

用 Map Manager QTXb19(Version0.29)连锁图谱构建软件中 'Make Linkage Groups '命令，在 P = 0.001 条件下将 1 744 个 AFLP 分子标记分离位点和 1 个绿茧标记 Gc 位点以及雌性决定作用 W 染色体标记位点，共 1 746 个位点分为 133 个连锁群，其中 327 个分离位点未进入连锁群。连锁位点率 81.3%，高于其他的 64.43%(朱玉芳等，2001)。用标记数不少于 10 个的连锁群，以及仅有 8 个标记的 W 染色体连锁群，共计 814 个标记，构建了 36 个连锁群的家蚕 AFLP 分子标记连锁图谱，作图位点率 46.6%。该连锁图中平均每个连锁群 23 个标记，最大连锁群 92 个标记，最少 8 个标记；该连锁图谱总图距 13 005 cM，平均图距 15.98 cM，两标记间图距最小 2.3 cM，最大 47.7 cM，两标记间图距大于 30 cM 的 gap 共有 39 个(图 5)。与已构建的其他家蚕 AFLP 框架图相比(万春玲等，2001；朱玉芳等，2001)，该连锁图谱具有标记数较多、平均图距较小等特点，便于进一步进行 QTL 定位以及目标基因的定位克隆研究。拟定的绿茧标记 LPT-Gr 与 LP7T7-13 和 LP11T5-1 位点紧密相连，其图距分别为 6.8 cM 和 15.9 cM。该连锁群对应于经典实验遗传连锁图的第 15 连锁群。

3 讨论

3.1 家蚕 AFLP 分子标记遗传连锁图谱比较

遗传连锁图谱的构建是为了基因的定位克隆及 QTL 定位研究，因此连锁图谱上的标记是越多越好，标记间的图距是越小越好。本研究所构建的家蚕 AFLP 分子标记遗传连锁图谱与其他已构建的家蚕 AFLP 标记遗传连锁图谱相比较(表 2)，具有标记数较多、标记间图距较小、覆盖家蚕基因组较大等特点，因此有利于进一步进行家蚕基因的定位克隆以及家蚕数量性状的 QTL 定位研究。已构建的所有家蚕 AFLP 分子标记遗传连锁图谱中即使有的图谱构建的连锁群比家蚕的 29 个(27 个常染色体，1 个 W 染色体和 1 个 Z 染色体)实验遗传连锁群多，但都未能够完全与家蚕的 29 个实验遗传连锁群相对应，用于家蚕全基因组以及其数量性状遗传研究，还有

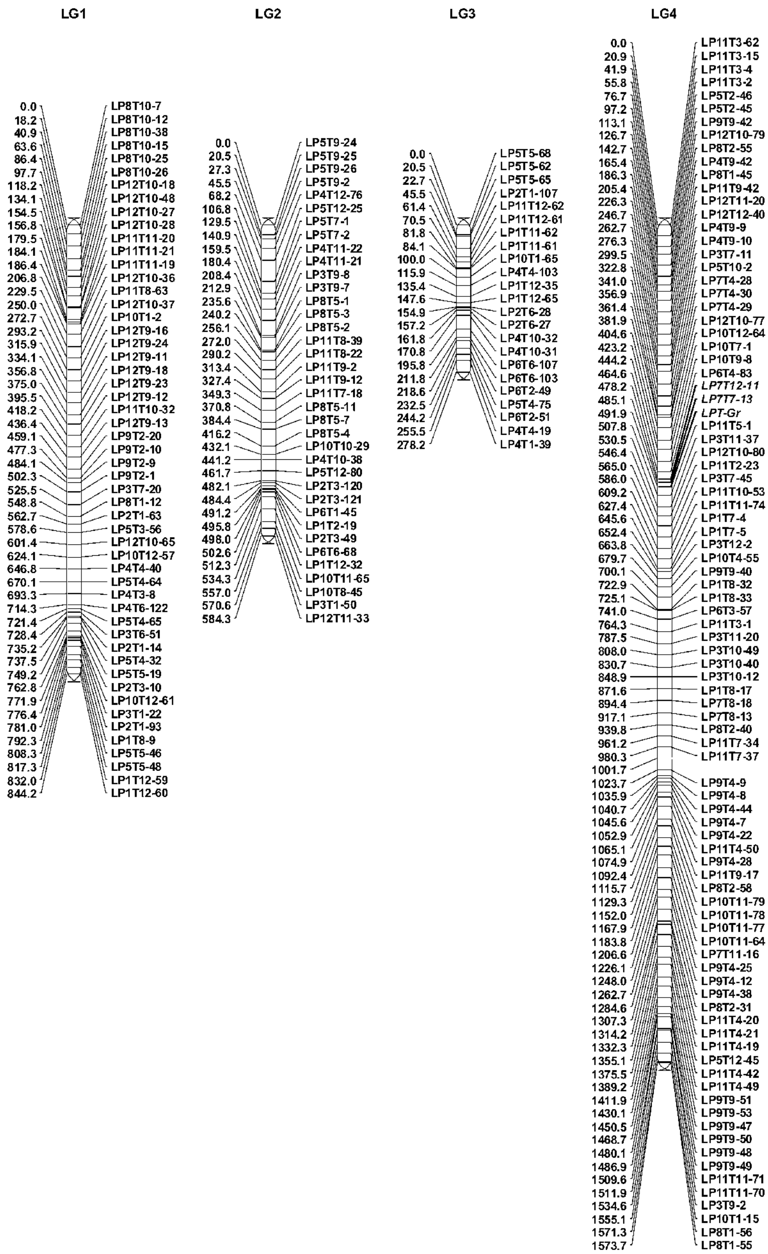


图 5　家蚕 AFLP 分子标记连锁图谱

Fig. 5　Linkage map of the silkworm based on AFLP

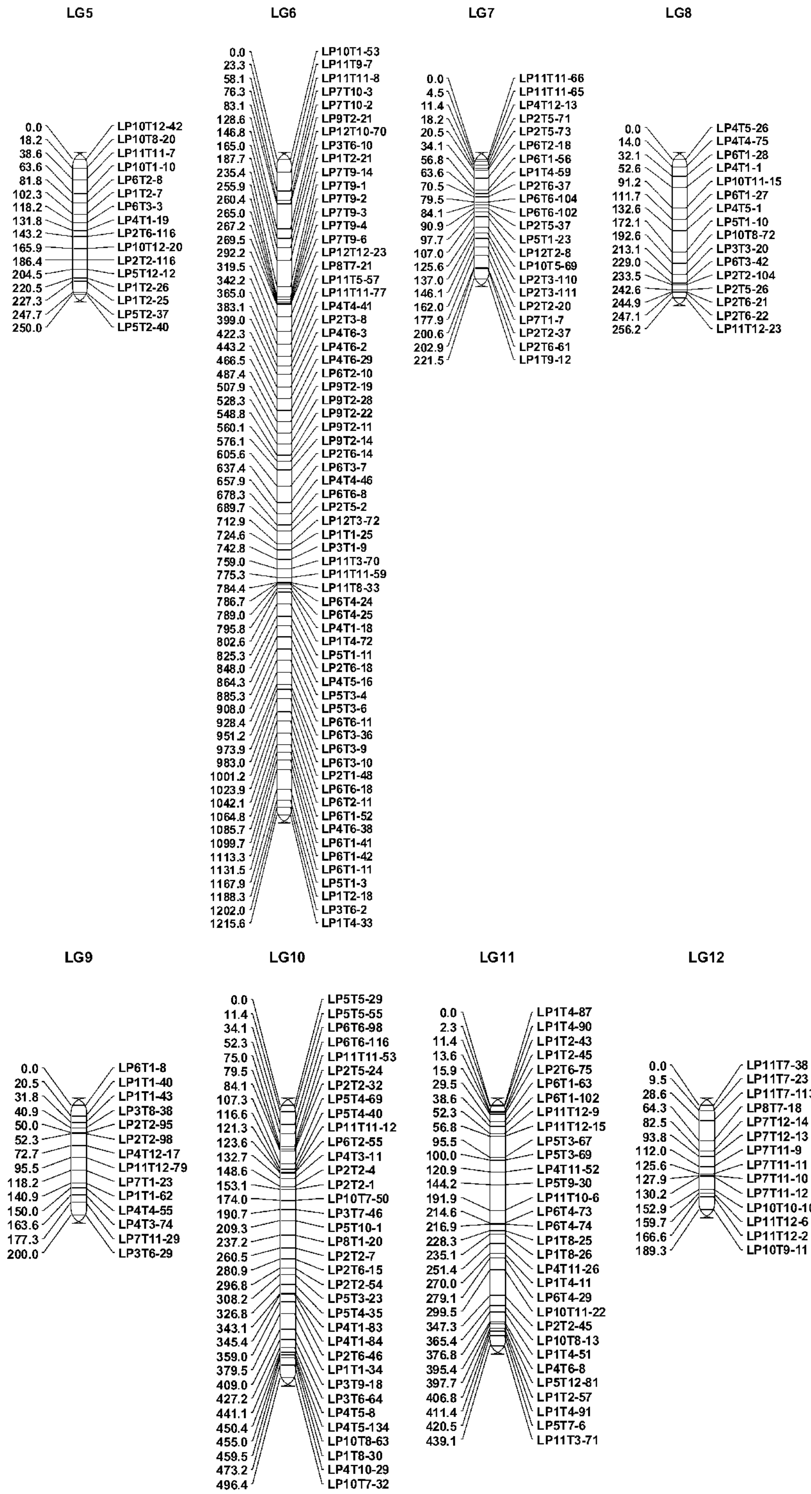


图 5 家蚕 AFLP 分子标记连锁图谱(续)

Fig. 5 Linkage map of the silkworm based on AFLP (continued)

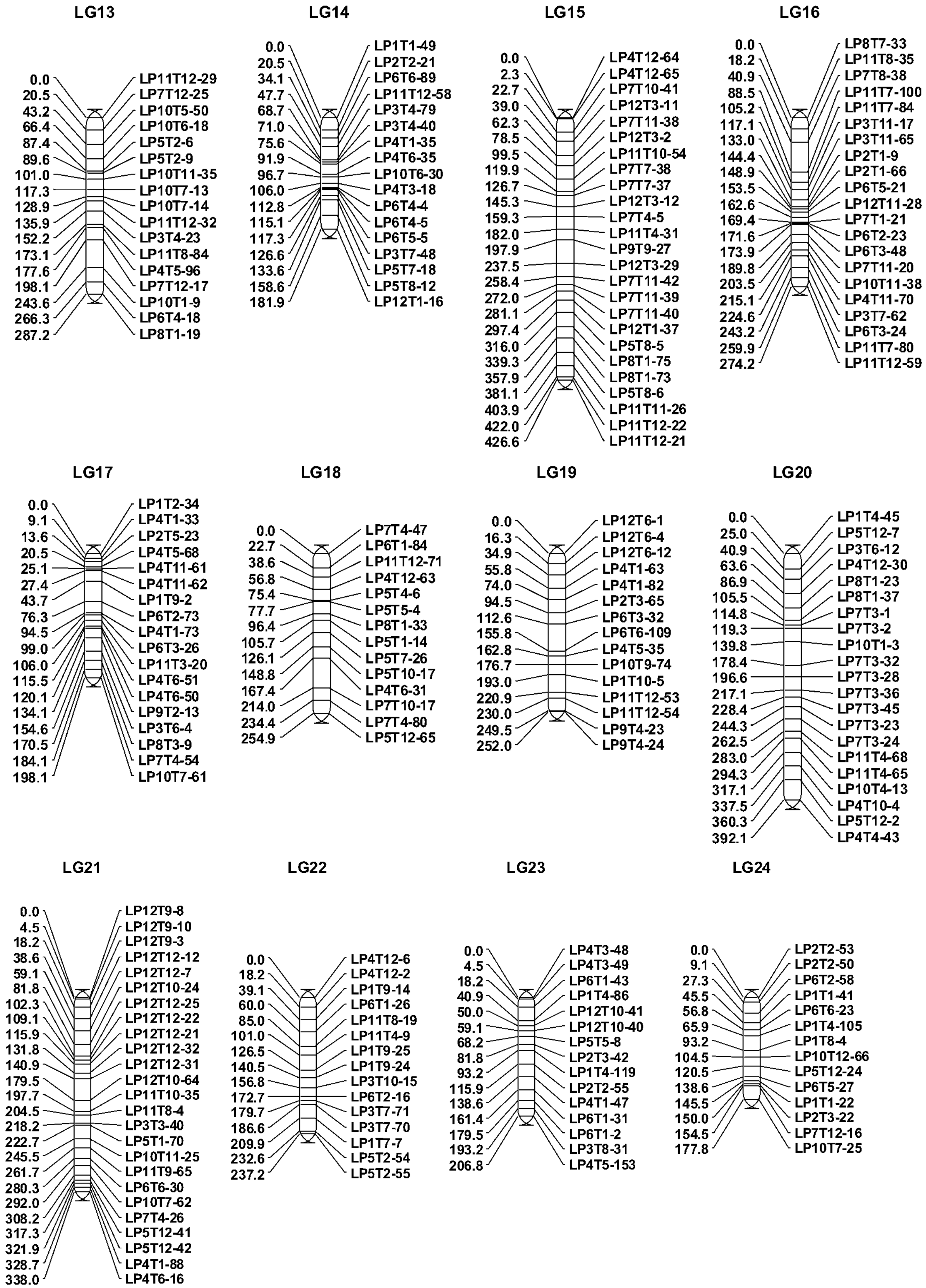


图 5　家蚕 AFLP 分子标记连锁图谱(续)

Fig. 5　Linkage map of the silkworm based on AFLP (continued)

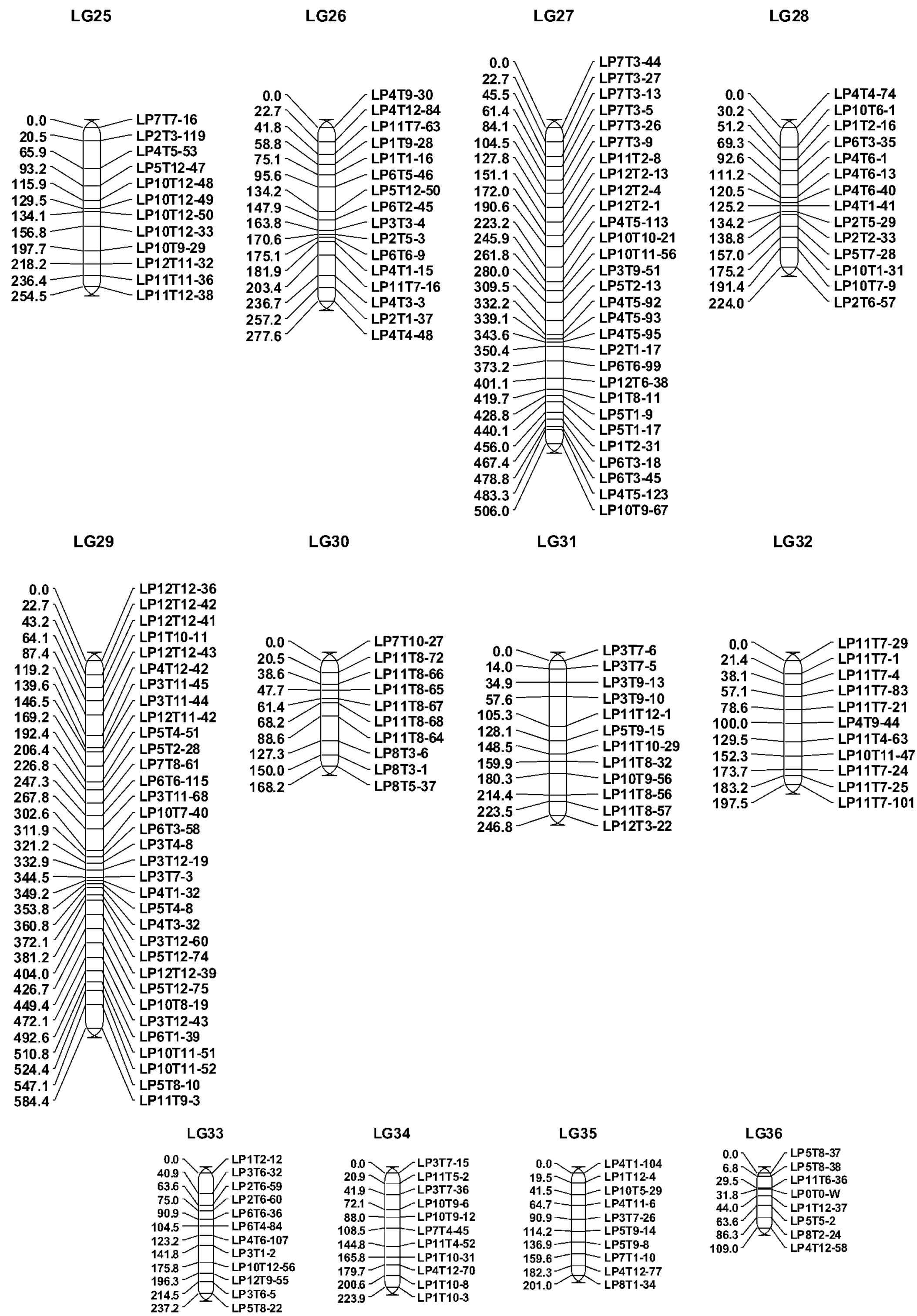


图 5 家蚕 AFLP 分子标记遗传连锁图谱(续)

Fig. 5 Linkage map of the silkworm based on AFLP (continued)

待于进一步完善。本研究构建的家蚕 AFLP 分子标记连锁图谱包含 36 个连锁群，可进一步开展基因的定位克隆和 QTL 定位研究。结合其他已构建的家蚕 AFLP 连锁图谱，逐渐完善 AFLP 分子标记图谱与实验遗传图谱的对应，以便应用于指导家蚕育种研究。

表 1　家蚕 AFLP 分子标记连锁图谱的比较

Table 1　Comparison of AFLP molecular linkage maps in silkworm

研究者 Investigator	作图群体 Generation	个体数 Number of individuals	总图距 Total map distance	标记数 Number of loci	连锁群 Numbers of group	平均图距 Average map distance	大于 30 点数 Number of gaps more than 30	大于 50 位点数 Number of gaps more than 50	最大图距 The largest map distance
万春玲 WAN CL	BC_1	47	3 285.5	159	26	27.15	53/2	53/2	52.8
朱玉芳 ZHU YF	BC_1	47	2 998.9	163	28	22.21	23/2	23/2	54.9
谭远德 TAN YD	BC_1	47	6 512	356	30	21.07	56/0	56/0	47.5
赵爱春 ZHAO AC	BC_1	44	3 676.7	256	33	14.36	22/4	22/4	119.9
本研究 This study	BC_1	44	13 005	814	36	15.98	39/0	39/0	47.7

已有研究表明家蚕的 W 染色体具有强雌性决定作用，但其作用机制尚不清楚。该 AFLP 分子标记遗传连锁图谱，结合形态标记除确定了与家蚕经典实验遗传连锁图谱的第 15 连锁群的对应关系外，还确定了家蚕的雌性决定 W 染色体连锁群，W 雌性决定连锁标记 LP_0T_0-W 与 LP11T6-3 和 LP1T12-37 位点紧密相连，其图距分别为 2.3 cM 和 12.2 cM。在此之前尚无有关 W 染色体连锁群标记的报道，W 染色体连锁群的标记将有助于家蚕性别调控机制研究。同时该 AFLP 分子标记遗传连锁图谱显示，W 染色体连锁群上 AFLP 分子标记数较少，仅有 8 个标记，明显较其他染色体上的 AFLP 标记位点数少，这一结果有利于进一步对 W 染色体连锁群的研究。

3.2　作图材料

构图材料的选择是影响构图效果的重要因素之一，构图材料的亲本间差异越大，分子标记的多态性就越丰富。因此本研究采用形态特征和生态型差异较大的两个亲本杂交及其回交一代为作图群体，用这样的亲本杂交可获得更多的多态性标记，构建高密度的分子标记连锁图谱，每组引物平均获得多态性标记 54 个。其二是现有的连锁遗传图谱构建软件均未考虑配子形成中不发生交换对使用 F_2 群体作图所产生的影响（谭远德等，2000），因此，本研究采用回交一代为构图群体可以避免由于家蚕雌完全连锁所带来的 F2 群体作图所不能检测其亲本中互斥相位点连锁关系的缺陷。

在分子标记遗传图谱的构建中，作图群体的大小也是影响构图效果的重要因素之一，关于构建分子连锁图谱的最小有效群体，尚无统一标准。已经构建的 AFLP 分子标记连锁图谱中，也有采用小样本作图群体的报道，如 Keim 等（1997）曾采用 42 个个体的作图群体构建了大豆的高密度 AFLP 连锁图谱。因此，根据实验条件本研究采用了 44 个个体作为构图群体。作图群体对构图效果的影响是群体越大，可检测的最大图距越大，可分辨的最小图距就越小。对于 44 个个体的回交群体，可以检测的最大图距约 33 cM，可以分辨的最小图距约 9 cM（徐云碧和朱立煌，1994）。以此构图标准判断，本研究所构建的家蚕高密度 AFLP 分子标记图谱较其他已构建的家蚕 AFLP 分子标记图谱更好，更具有实用性。与 SSR、RAPD 分子标记构图相比较，用 AFLP 分子标记构建的家蚕遗传连锁图谱比 SSR、RAPD 分子标记构建的家蚕遗传连锁图谱在标记间的平均图距上更大，这一方面可能与不同分子标记类型有关，不同分子标记类型在染色体上的分布密度不同；二是可能与作图群体大小有关，如 SSR 分子标记图谱的构建用 189 个个体，其平均图距 6.63 cM（Miao *et al*.，2005）；RAPD 分子标记图谱的构建用 166 个个体，其平均图距 3.54～4.02 cM（Yasukochi，1998）。

参 考 文 献（References）

Bentolila S，Guitton C，Bouvet N，Sailland A，Nykaze S，Freyssinet G，1991. Identification of an RFLP markers tightly linked to the Htl gene in maize. *Theor Genet*.，82：393－398.

Chang Q，Zhou KY，1998. Phylogeny reconstruction in the study of

molecular evolution. *Chinese Biodiversity*, 6(1):55-62. [常青,周开亚,1998. 分子进化研究中系统发生树的重建. 生物多样性, 6(1):55-62]

Dai FY, Lu C, Xiang ZH, 2005. Mutation gene of silkworm. In: Xiang ZH ed. Biology of Sericulture. China Forestry Publishing House, Beijing. 130-132. [代方银,鲁成,向仲怀,2005. 家蚕的突变基因. 见:向仲怀主编. 蚕丝生物学. 北京:中国林业出版社. 130-132]

Goldsmith MR, 1991. The *Bombyx* genome mapping project. *Sericologia*, 31 (Suppl.):24-25.

Goldsmith MR, Shi J, 1994. A molecular map for the silkworm: constructing new links between basic and applied research. *American Chemical Society Symposium Series*, 544:45-48.

Hao ZF, Li XH, Zhang SH, 2005. Towards an expanded linkage map and exploration on co-dominant scoring of AFLPs in maize. *Acta Genetica Sinica*, 32(9):960-968. [郝转芳,李新海,张世煌,2005. 玉米相对饱和遗传连锁图谱构建与一种新的 AFLPs 共显性分析方法探讨. 遗传学报, 32(9):960-968]

Ji YB, Qu DY, 1997. Application of RFLP to potato breeding. *Chinese Vegetable*, (4):48-51. [纪颖彪,屈冬玉,1997. RFLP 在马铃薯育种中的应用. 中国蔬菜, (4):48-51]

Keim P, Schupp JM, Travis SE, Clayton K, Zhu T, Shi L, Ferreira A, Webb DM, 1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci.*, 37(2):537-543.

Li B, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2000. Construction of silkworm RAPD molecular linkage map. *Acta Genetica Sinica*, 27(2):127-132. [李斌,鲁成,周泽扬,向仲怀,2000. RAPD 标记构建家蚕分子连锁图. 遗传学报, 27(2):127-132]

Li XL, Gong YF, Liu ZZ, Feng MS, Liu JF, Zhang JW, 2004. RAPD markers of boer goat body weight and genetic linkage map. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 24(3):295-297. [李祥龙,巩元芳,刘铮铸,冯敏山,刘金福,张建闻,2004. 波尔山羊体质量生长随机扩增多态 DNA 标记及遗传连锁图谱构建. 中国兽医学报, 24(3):295-297]

Luch M, 1990. The similarity index and DNA finger printing. *Molecular Biology and Evolution*, 7:478-484.

Mackill DJ, Zhang Z, Redona ED, Colowit PM, 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *J. Genome*, 39(5):969-977.

Manly KF, Cudmore RHJr, Meer JM, 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome*, 12:930-932.

Miao XX, Xu SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Susan WM, David RM, Zeng PY, Mita K, Jia SH, Zhang Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhang XL, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang ZH, Wang SY, Goldsmith M R, Lu C, Zhao GP, Huang YP, 2005. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(45):16 303-16 308.

Promboon A, Shimada T, Fujiwara H, Kobayashi M, 1995. Linkage map of RAPDs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet. Res. Camb.*, 66:1-7.

Shi J, Heckel DG, Goldsmith MR, 1995. A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on RFLPs. *Gent. Res. Camb.*, 66:109-126.

Tan YD, Wan CL, Lu C, Xiang ZH, 2000. Maximum likelihood method for mapping dominant-recessive molecular markers of lepidopteron species without genetic recombination in female using F_2 population. *Journal of Biomathematics*, 15(2):180-188. [谭远德,万春玲,鲁成,向仲怀,2000. 用 F1 雌不发生交换的 F_2 群体作显隐性分子标记连锁图谱的极大似然(ML)法. 生物数学学报, 15(2):180-188]

Tan YD, Wan CL, Zhu YF, Lu C, Xiang ZH, Deng HW, 2001. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm. *Genetics*, 157:1 277-1 284.

Voorips RE, Jongerius MC, Kanne HJ, 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassrcae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 94:75-82.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Rejans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21):4 407-4 414.

Wan CL, Tan YD, Zhu YF, He YY, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2001. Construction of molecular map of the silkworm (*Bombyx mori* L.) using AFLP markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 34(3):338-341. [万春玲,谭远德,朱玉芳,贺一原,鲁成,周泽扬,向仲怀,2001. 利用 AFLP 标记构建家蚕分子连锁图谱. 中国农业科学, 34(3):338-341]

Wang WJ, Kong J, Dong SR, Luan S, Wang QY, 2006. Genetic mapping of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* using AFLP markers. *Acta Zoologica Sinica*, 52(3):575-584. [王伟继,孔杰,董世瑞,栾生,王清印,2006. 中国明对虾 AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建. 动物学报, 52(3):575-584]

Wang B, Weng ML, 1996. Principle and application of AFLP. *Hybrid Rice*, (5):27-29. [王斌,翁曼丽,1996. AFLP 的原理及其应用. 杂交水稻, (5):27-29]

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6 531-6 535.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Xiang ZH, 1998. The molecular phylogeny study of the geographical races of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 41(1):32-40. [夏庆友,周泽扬,鲁成,向仲怀,1998. 家蚕不同地理品种分子系统学研究. 昆虫学报, 41(1):32-40]

Xiong LZ, Wang SP, Liu KD, Dai XK, Saghai Maroof MA, Hu JG, Zhang QF, 1998. Distribution of simple sequence repeat and AFLP markers in molecular linkage map of rice. *Acta Bontanica Sinica*, 40(7):605-614. [熊立仲,王石平,刘克德,戴先凯,Saghai Maroof MA,胡锦国,张启发,1998. 微卫星 DNA 和 AFLP 标记在水稻分子标记连锁图上的分布. 植物学报, 40(7):605-614]

Xu YB, Zhu LH, 1994. Molecular Quantitative Genetics. China Agriculture Press, Beijing. 81-85. [徐云碧,朱立煌,1994. 分子数量遗传学. 北京:农业出版社. 81-85]

Yasukochi Y, 1998. A dense genetic map of silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 150:1 513-1 525.

Zabeau M, Vos P, 1992. Selective restriction fragment amplification: A

general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, Publication Number EP 0534858.

Zhao AC, Lu C, Li B, Pu XY, Zhou ZY, Xiang ZH, 2004. Construction of AFLP molecular markers linkage map and location of green cocoon gene in silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Genetica Sinica*, 31(8): 787－794. [**赵爱春,鲁成,李斌,普孝英,周泽扬,向仲怀**, 2004. **家蚕** AFLP **分子连锁图谱的构建及绿茧基因定位**. **遗传学报**, 31(8): 787－794]

Zhu YF, Tan YD, Wan CL, He YY, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2001. Construction of AFLP linkage map of the silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Entomologica Sinica*, 44(4): 483－493. [**朱玉芳,谭远德,万春玲,贺一原,鲁成,周泽扬,向仲怀**, 2001. **家蚕** AFLP **连锁框架图谱的构建**. **昆虫学报**, 44(4): 483－493]

(责任编辑：黄玲巧)